

CAPÍTOL 3. ESTRUCTURA QUÍMICA, NOMENCLATURA I BIOSÍNTESI DELS AG.

3.1. ESTRUCTURA QUÍMICA I NOMENCLATURA DELS AG.

Els AG posseeixen una cadena hidrocarbonada de 12 a 24 àtoms de carboni, en el cas dels més comuns, i un grup carboxil terminal. Encara que poden existir en forma lliure, els AG generalment es troben com a èsters de glicerol (triglicèrids, fosfoglicèrids), colesterol o altres alcohols.

Si la cadena alquímica dels AG no posseeix cap doble enllaç s'anomenen saturats, a excepció dels dos àtoms de carboni terminals tota la resta d'àtoms de carboni estan units a dos àtoms d'hidrogen. Quan dos àtoms adjacents de carboni estan units tant sols a un àtom d'hidrogen, apareix una doble unió entre els àtoms de carboni, són els anomenats àcids grassos insaturats. Si la cadena conté tant sols un doble enllaç, parlem d'àcids grassos monoinsaturats (AGMI), i si la cadena conté més d'un doble enllaç, aleshores els anomenem àcids grassos poliinsaturats (AGPI) (**figura 3.1**). Aquests dobles enllaços mostren una configuració estereoquímica *cis*, a diferència dels enllaços senzills que l'adopten *trans*, i es troben separats per un o més grups metilènics segons l'estructura general: $-\text{CH}=\text{CH}-(\text{CH}_2)_x-\text{CH}=\text{CH}-$.^{208,277}

La sistemàtica dels AG saturats adopta noms químics que denoten el número d'àtoms de carboni. La presència d'un doble enllaç s'indica pel canvi del sufix -anoic per -enoic, així els AGMI i AGPI també poden ésser anomenats AG monoenoics o polienoics respectivament. Els sufixos -dienoic, -trienoic,... indiquen dos, tres, o més dobles enllaços. Alhora, la posició del doble enllaç s'indica pel símbol amb exponents que especifiquen els àtoms de carboni implicats en el

doble enllaç i numerats a partir del carboxil terminal, per exemple l'àcid ⁹ octadecenoic o l'àcid ^{9,12,15} octadecatrienoic (**figura 3.1**).

A més d'aquesta nomenclatura química rigorosa existeix un sistema de noms trivials que s'utilitza àmpliament, així la forma més general de l'àcid ⁹ octadecenoic és coneguda també com àcid oleic o la forma més comuna de l'àcid ^{9,12,15} octadecatrienoic es coneix com àcid ω -linolènic. Els AG es simbolitzen de forma abreujada amb una nomenclatura que indica la longitud de la cadena, el número i la posició dels dobles enllaços. Així doncs, a l'actualitat, els AG es

representen de forma abreujada amb la fórmula general: **CX:YnZ**, on **X** representa el número d'àtoms de carboni de la cadena, **Y** el número de dobles enllaços i **Z** la posició del primer doble enllaç a partir del grup metil terminal. Els AG saturats i insaturats més comuns s'especifiquen a la **taula 3.1**.

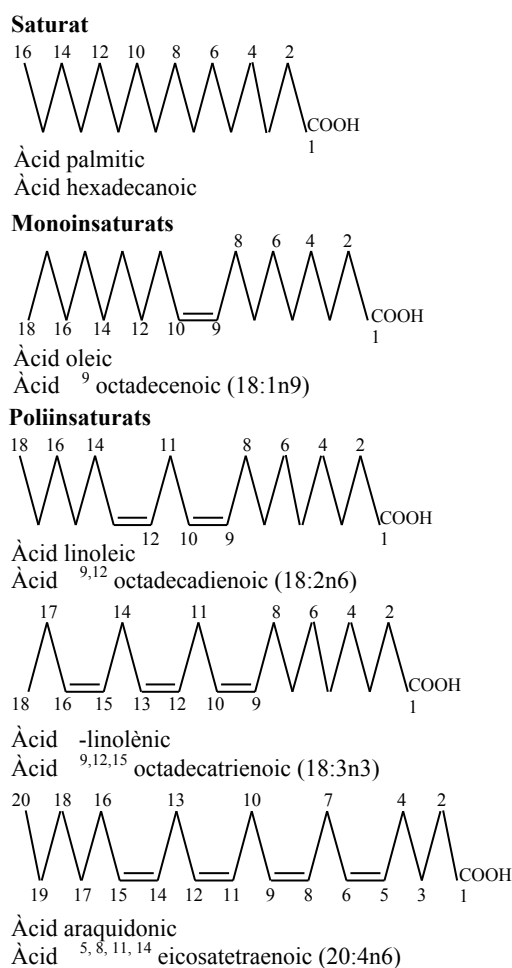


Figura3.1.: Estructura química d'alguns AG

reaccions d'elongació i dessaturació.

Els AGPI de les sèries n3 i n6 són els més abundants als mamífers. Posseeixen importants funcions biològiques, tant estructurals (membranes cel·lulars) com metabòliques (eicosanoides, PAF,...). Els seus precursors, els àcids ω -linolènic (C18:3n3) i linoleic (C18:2n6), es consideren AG essencials perquè els mamífers els requereixen pel seu normal desenvolupament i integritat fisiològica i no els poden sintetitzar davant la impossibilitat d'introduir una ω -dessaturació en els carbonis 12 o 15 a partir de precursors saturats o monoenoics. Per tant aquests AG s'han d'obtenir necessàriament a través de la dieta.⁴⁴ El dèficit d'AG essencials produeix una síndrome clínica que es caracteritza pel retard en el creixement, alguns símptomes externs (dermatitis escamosa, hipopigmentació, hipotonia muscular i necrosi caudal a alguns animals) i lesions inespecífiques a molts teixits.²⁰⁷ Aquesta síndrome també queda palesa en la nutrició enteral exempta de lípids.^{164,183} La reintroducció dels lípids a les formulacions dietètiques reverteix el problema.⁴⁵ Recentment s'ha fet evident que la deficiència d'AG essencials és secundària a diferents trastorns, incloent la malnutrició energètic-proteïca i la malabsorció de greixos.

Els àcids oleic (C18:1n9) i palmitoleic (C16:1n7), precursors de les sèries n9 i n7, respectivament, són de procedència endògena i exògena. En el cas dels mamífers, es troben principalment al teixit adipós on són sintetitzats a partir de l'àcid esteàric (C18:0) i l'àcid palmític (C16:0) després d'una reacció de ω -dessaturació.²⁰⁸ Aquestes sèries d'AGPI són, qualitativament, menys importants que les sèries n3 i n6, encara que la seva síntesi pot estar incrementada en situacions de dèficit d'AG essencials.

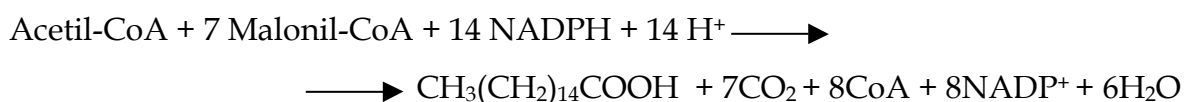
3.2. BIOSÍNTESI DELS AG.

3.2.1. Biosíntesi dels AG saturats.

El fetge i el teixit adipós són els òrgans més importants per la biosíntesi dels AG

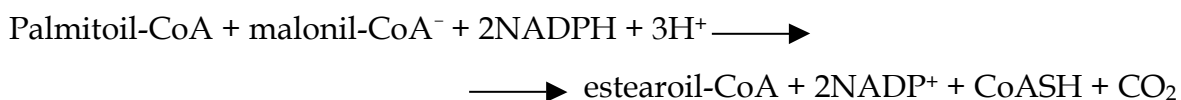
saturats, tot i que hi ha òrgans com la pell, el teixit adipós marró i el budell prim que també estan relacionats amb processos lipogènics, encara que quantitativament menys importants.^{5,206} Concretament al citoplasma cel·lular, l'acetil-CoA provinent de la matriu mitocondrial funciona com un precursor immediat de la síntesi d'AG per l'acció de l'enzim Acetil-CoA-carboxilasa que catalitza la carboxilació de l'acetil-CoA en presència d'ATP i bicarbonat, el resultat final és el malonil-CoA que comporta un allargament de la cadena en dos àtoms de carboni.

La síntesi d'AG a partir del malonil-CoA implica una sèrie ordenada de condensacions (per augmentar la longitud de la cadena) i reduccions (des dels grups carbonils a metils), aquestes reaccions es produeixen sobre un complex multienzimàtic anomenat AG-sintetasa, que, en general, està integrat per set enzims i una unitat funcional, que en els mamífers és idèntica a una part de la molècula d'acetil-CoA.³³³ En el primer cicle, el malonil-CoA es condensa amb l'acetil-CoA perdent un àtom de diòxid de carboni i el -compost que es produeix és reduït, deshidratat, i reduït un altre cop formant tioèsters intermedis que esdevindran acil-CoA (butanoil-CoA) de quatre carbonis saturats. En els cicles següents (fins un màxim de set) es produeixen addicions seqüencials de grups acetils provinents del malonil-CoA que es condensen amb la cadena d'AG en creixement i es redueixen fins obtenir l'àcid palmític (16 carbonis), producte final del sistema AG-sintetasa, essent la reacció global:



En el teixit adipós hi ha AG de cadena més llarga que la de l'àcid palmític, tot i no haver aportació per part de la dieta d'aquests àcids de 18 a 24 carbonis. Les reaccions d'elongació addicional de la cadena de l'àcid palmític (C16:0) a esteàric (C18:0) semblen ser iguals a les de la síntesi del palmític, però els enzims es troben

associats al reticle endoplasmàtic de les cèl·lules hepàtiques. La reacció global de l'etapa d'elongació de la cadena es pot representar de la següent manera:



D'altra banda, l'elongació de la cadena també pot ocórrer per l'acció d'un sistema enzimàtic mitocondrial, probablement associat a la síntesi d'àcids grassos de la membrana d'aquest orgànu. En aquest cas, la principal font dels grups acils és l'acetil-CoA i el poder reductor és aportat per NADH.^{277,333}

Malgrat que la principal via d'incorporació d'AG saturats prové de la ingesta, la dieta també pot modificar la síntesi endògena d'aquests AG. Així, tant al fetge com al teixit adipós la glucosa indueix i els AGPI suprimeixen la síntesi *de novo* d'AG, probablement actuant sobre l'expressió gènica de l'acetil-CoA-carboxilasa i de l'AG-sintetasa.^{104,166,227}

3.2.2 Biosíntesi dels AG insaturats.

Una proporció significativa (>50%) dels AG esterificats als triglicèrids i fosfolípids humans són insaturats.¹⁷⁴ Tot i que la insaturació es porta a terme per enzims presents al fetge, hi ha certs AGPI requerits per l'organisme i que no poden ésser sintetitzats per aquesta via, aquests AG són els esmentats anteriorment com AG essencials, els quals han d'ésser incorporats a l'organisme a través de la dieta.

La introducció d'un doble enllaç dintre d'una cadena llarga-acil-CoA és portada a terme per les dessaturases (o acil-CoA-dessaturases). Aquests enzims estan fixats a la bicapa lipídica dels microsomes al reticle endoplasmàtic llis i estan relacionats amb una flavoproteïna i amb el citocrom b₅. Aquest complex enzimàtic és un sistema transportador d'electrons de funcionalitat mixta oxidasa (NADPH/O₂). La reducció del O₂ molecular genera un radical superòxid que, catalitzat per l'enzim,

oxida l'acil-CoA introduint-li un doble enllaç en una posició determinada, segons l'especificitat de la dessaturasa.^{62,455,457,465,476} La reacció de dessaturació inclou l'eliminació de dos àtoms d'hidrogen provinents de l'AG saturat. Sent els productes finals de la reacció H₂O i l'AG insaturat.

Taula 3.1: Nomenclatura dels àcids grassos més freqüents als mamífers.

NOM TRIVIAL	NOM SISTEMÀTIC	ABREVIATURA
<u>Saturats:</u>		
Mirístic	Tetradecanoic	C14:0
Palmític	Hexadecanoic	C16:0
Estèaric	Octadecanoic	C18:0
<u>Monoenoics (AGMI):</u>		
Palmitoleic	⁹ hexadecanoic	C16:1n7
Oleic	⁹ octadecanoic	C18:1n9
<u>Polienoics (AGPI):</u>		
Linoleic	^{9,12} octadecadienoic	C18:2n6
-linolènic	^{6,9,12} octadecatrienoic	C18:3n6
Dihomo- -linolènic	^{8,11,14} eicosatrienoic	C20:3n6
Araquidònic (AA)	^{5,8,11,14} eicosateraenoic	C20:4n6
Adrènic	^{7,10,13,16} docosateraenoic	C22:4n6
Docosapentaenoic	^{4,7,10,13,16} docosapentaenoic	C22:5n6
-linolènic	^{9,12,15} octadecatrienoic	C18:3n3
Eicosapentaenoic (EPA)	^{5,8,11,14,17} eicosapentaenoic	C20:5n3
Docosapentaenoic	^{7,10,13,16,19} docosapentaenoic	C22:5n3
Docosahexaenoic (DHA)	^{7,10,13,16,19} docosahexaenoic	C22:6n3
Eicosatrienoic	^{5,8,11} eicosatrienoic	C20:3n9

Les ⁹, ⁶, ⁵, ⁴-dessaturases introdueixen insaturacions en les posicions 9, 6, 5, 4, respectivament, tot i que en alguns estudis es qüestiona la presència de la ⁴-dessaturasa.¹⁹ Si el substrat està saturat, el primer doble enllaç s'insereix sempre en posició 9, mentre que si el substrat presenta alguna insaturació, el doble enllaç s'insereix entre el grup carboxil terminal i el doble enllaç més proper a aquest. En aquest sentit, dessaturases exclusives de plantes i d'éssers unicel·lulars tenen la capacitat d'introduir nous dobles enllaços a partir de l'àcid oleic en la posició 12

(¹²-dessaturasa) i posteriorment en posició 15 (¹⁵-dessaturasa), el que es tradueix en la producció de l'àcid linoleic (C18:2n6) i l'àcid α -linolènic (C18:3n3) respectivament.⁶⁷

Generalment, en les etapes consecutives de la dessaturació s'alternen amb etapes d'elongació de les cadenes, en les que tots els dobles enllaços introduïts per aquesta activitat solen presentar una isomeria *cis* (**figura 3.2**).

3.2.2.1. Biosíntesi dels AG monoinsaturats (AGMI).

La síntesi dels àcids oleic (C18:1n9) i palmitoleic (C16:1n7) és conseqüència de la introducció d'un doble enllaç per ⁹-dessaturasa utilitzant com a substrats l'àcid esteàric (C18:0) i palmític (C16:0), respectivament, en forma de tioester de la CoA.

La ⁹-dessaturasa està present de forma universal tant a plantes com a diferents teixits animals. Tècniques de clonatge i expressió del gen en *E. coli* han permès aprofundir en la bioquímica lipídica i la genètica molecular d'aquest enzim.^{479,496} L'estructura d'aquest enzim presenta gran similitud a les dessaturases ⁶, ⁵ i ⁴, està constituït per una simple cadena polipeptídica de 53.000 Daltons que conté un àtom de Fe no associat a un grup hemo. Es tracta d'una proteïna hidrofòbica que està profundament unida a la membrana microsomal, el que comporta un cert problema tècnic a l'hora de precisar els mecanismes de la seva regulació.⁶⁷

L'activitat ⁹-dessaturasa disminueix amb el dejú i a la diabetis, mentre que el consum de proteïnes i l'administració d'insulina restaura la seva activitat.⁶² Aquests efectes són deguts a canvis en la concentració enzimàtica per inhibició o inducció de la seva síntesi.

El consum de dietes amb un elevat nivell de colesterol incrementa l'activitat ⁹-dessaturasa donant com a resultat un augment del coeficient AGMI/AG saturats,

d'aquesta manera l'enzim podria intervenir a la regulació de la fluïdesa dels fosfolípids de membrana quan no hi ha aportació d'AG saturats des de la dieta.

3.2.2.2. Biosíntesi d'AGPI.

Els AGPI s'obtenen després de successives reaccions de dessaturació i elongació dels seus precursors en forma d'acil-CoA. Així doncs, els èsters acil-CoA d'AG monoinsaturats esdevenen substrats per les dessaturases formant AG amb més d'un doble enllaç.

En el cas de l'àcid oleic (C18:1n9) aquesta acció implica l'aparició de l'àcid linoleic (C18:2n6) per la ¹²-dessaturasa i posteriorment, per acció de la ¹⁵-dessaturasa, l'àcid α -linolènic (C18:3n3). Com s'ha esmentat, el fet que aquests enzims no estiguin presents als animals fa que els seus productes els hagin d'incorporar a través de la dieta per no patir alteracions metabòliques.⁷⁶

Als animals, la ⁶-dessaturasa introdueix una nova insaturació entre el carboni 6 i 7 a cada un dels precursors de les famílies d'AG (C18:1n9, C18:2n6, C18:3n3 i C16:1n7). El mecanisme és similar al descrit anteriorment per la ⁹-dessaturasa. Pel contrari, el sistema enzimàtic que porta a terme l'elongació de les cadenes és molt menys conegut, i té lloc mitjançant l'addició de grups acetil provinents del malonil-CoA als precursors acilats al CoA. Això permetrà incorporar noves insaturacions per l'acció de ⁵- i ⁴-dessaturasa (**figura 3.2**). Els complexos enzimàtics de dessaturació i elongació són comuns per a totes les famílies d'AGPI, produint una varietat d'AGPI necessaris pel manteniment de la membrana i producció d'eicosanoides.^{63,471} Està generalment acceptat que els elements d'una sèrie determinada només poden derivar dels seus precursors respectius i mai d'elements d'altres sèries d'AGPI, és a dir, les quatre famílies d'AGPI no poden interconvertir-se *in vivo*.²⁰⁹

El fet que tots els precursors i productes intermedis de les diferents famílies d'AG siguin metabolitzats pel mateix sistema enzimàtic implica una complexa modulació competitiva en la biosíntesi dels AGPI. Per exemplificar-ho, destacar la major afinitat de la Δ^6 -dessorasa per l'àcid γ -linolènic (C18:3n3) que per l'àcid linoleic (C18:2n6), i a la vegada, aquest darrer té més afinitat per l'enzim que l'àcid oleic (C18:1n9) (**figura 3.2**).^{58,61,209}

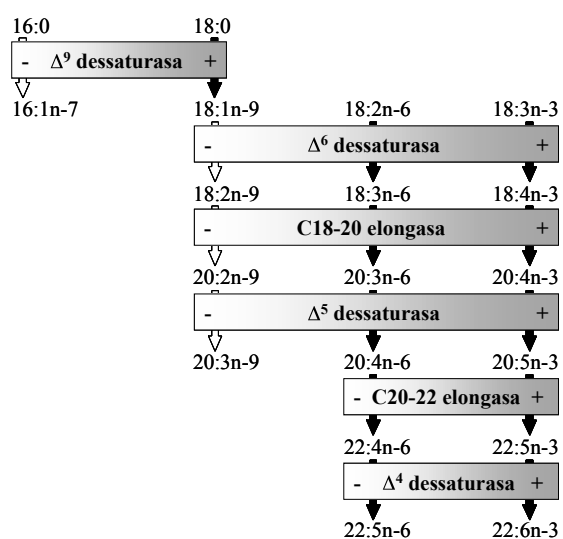


Figura 3.2.: Biosíntesi dels AGPI. Els AG de cadena llarga de les sèries n6 i n3 deriven desl AGE: àcid linoleic i γ -linolènic respectivament. Els sistemes enzimàtics es representen amb una gradació cromàtica (de - a +) que vol significar la mínima i màxima activitat enzimàtica respectivament. Les fletxes en blanc expresen les vies metabòliques que adquireixen protagonisme "in vivo" en estats de deficiència d'AGE.

S'ha demostrat que la via quantitativament i qualitativament més important és la de la sèrie n6, en la qual l'àcid linoleic (C18:2n6) és convertit a AA (C20:4n6). De fet la dieta conté suficient quantitat d'àcid linoleic com per dotar contínuament de l'àcid araquidònic necessari en cada moment als diferents teixits. Quan es produeixen situacions de dèficit d'àcid linoleic, les altres famílies d'àcids C18 insaturats passen a predominar a la via metabòlica que ens ocupa sobre la família n6.

La via metabòlica que deriva de l'àcid γ -linolènic (C18:3n3) transcorre de forma paral·lela a la de l'àcid linoleic (C18:2n6). Els productes més importants d'aquesta sèrie són l'EPA (C20:5n3) i l'DHA (C22:6n3), trobant-se en major quantitat en el sistema nerviós.^{50,470}

En condicions normals, els productes provinents de la dessoració i elongació de l'àcid oleic (C18:1n9) es detecten en quantitats baixes. No és així en situacions de dèficit d'AG essencials en què apareix un augment dels productes finals de la família n9, concretament l'àcid eicosatrienoic (C20:3n9), possiblement en un intent

de compensar la funció estructural de manteniment de la membrana.^{37,209}

La seqüència metabòlica de la sèrie n7 sembla que no és operativa *in vivo* ni en aquelles situacions de dèficit greu d'AG essencials, probablement perquè la reacció catalitzada per la Δ^6 -dessorasa es produeix molt lentament.³⁷

3.2.3. Regulació de la dessoració i elongació.

Avui en dia la regulació de la biosíntesi d'AGPI no està del tot establerta, principalment per la dificultat que representa l'aïllament d'aquests complexos enzimàtics de la membrana, on es troben profundament ancorats degut al seu caràcter hidrofòbic.

El que ha estat clarament diferenciat en cultius cel·lulars és una activitat elongasa molt més elevada que l'activitat dessorasa.⁴⁶⁹ Alhora, estudis amb microsomes hepàtics i hepatòcits de rates donen suport a la hipòtesi que la Δ^6 -dessorasa és l'enzim regulador més important a la biosíntesi d'AGPI.^{64,99}

3.2.3.1. Les dessorases.

L'activitat d'aquests complexos enzimàtics està influïda per factors de tipus físic com la temperatura. Hi ha estudis que han demostrat un augment de l'activitat Δ^5 - i Δ^6 -dessorasa davant un descens de la temperatura.^{284,513} Però, a més d'aquests factors, l'activitat dessorasa està influïda per hormones,²⁷⁷ la disponibilitat relativa de diversos micronutrients,^{118,119} i la ingesta o no de determinats macronutrients.¹³¹

La biodisponibilitat dels diferents AGPI comporta un mecanisme de modulació sobre l'activitat dessorasa al que hem d'afegir, tal i com ja hem esmentat anteriorment, la impossibilitat d'interconversió de les diferents sèries d'AGPI (tot i que els elements d'una sèrie si són capaços de modificar la biosíntesi de les sèries

restants).⁵⁹ Sent l'afinitat preferent d'aquests complexos enzimàtics $n3 > n6 > n9 > n7$.^{50,59,61} D'altra banda, la competència seria més intensa per les dessaturases que per les elongases, el que addicionalment comportaria esbrinar la taxa òptima dietètica AGPI_{n3}/AGPI_{n6}.²⁰⁹

Encara que no es conegui quina proporció dels AGPI de l'organisme procedeix de la dieta i quina és d'origen endogen, si que està ben establerta la possibilitat de modificar la composició del perfil d'AG de l'organisme mitjançant canvis a la dieta. Aquest fet s'ha demostrat en el cas de lípids circulants,³⁰⁴ a la membrana plasmàtica de les plaquetes,^{142,184,522} dels hematies,¹⁴² dels limfòcits,⁵⁰² i dels hepatòcits,^{326,522} així com a les membranes d'òrgans cel·lulars.⁴⁸⁴

L'enzim clau en la regulació de la biosíntesi d'AGPI sembla ser la Δ^6 -dessaturasa. La seva regulació no tant sols és deguda al substrat, sinó que a més posseeix un mecanisme de regulació *feedback* negatiu segons el qual es produeix una inhibició de la dessaturació pels productes immediats a la reacció (per exemple: l'Àc. Gamma-linoleic (C18:3n6)), els metabòlits intermedis, i, fins i tot, pels productes finals de cada sèrie (AA, EPA i DHA).^{58,61} La regulació dels processos intermedis d'elongació i Δ^5 -dessaturació es produeix simultàniament.³¹³

L'enzim Δ^4 -dessaturasa gaire bé no es coneix i no existeix una evidència real que el doble enllaç en posició 4 dels àcids docosapentaenoic (C22:5n6) i DHA (C22:6n3) s'introdueixi de la mateixa manera que els altres dobles enllaços. Recentment s'ha suggerit que la producció de C22:5n6 i C22:6n3, podria tenir lloc via elongació dels respectius precursors (C22:4n6 i C22:5n3) a C24:4n6 i C24:5n3, i posteriorment una Δ^6 -dessaturació produiria C24:5n6 i C24:6n3. Llavors, aquests compostos podrien ser reconvertits a C22:5n6 i C22:6n3 via α -oxidació peroxisomal.⁴⁶⁸ En tot cas, si això fos així, la regulació d'aquesta via metabòlica es complicaria per la intervenció d'altres complexos enzimàtics i per les noves interaccions competitives sobre la Δ^6 -dessaturasa.⁶⁷

Les dessaturases estan sota control endocrí. Hormones com la insulina, les catecolamines, el glucagó, els glucocorticoides i les hormones tiroidees tenen la capacitat d'exercir efectes estimuladors o inhibidors de la biosíntesi d'AGPI.⁶⁷ Donat que aquestes hormones són les responsables del metabolisme dels carbohidrats i de la síntesi d'AG saturats, el procés de biosíntesi d'AGPI queda integrat i coordinat dins del conjunt del metabolisme de principis immediats.

S'ha demostrat l'existència d'un ritme circadià en l'activitat dessaturasa dels AG, relacionat en la seqüència inješta-dejú.³ Probablement aquest cicle circadià està vinculat amb els cicles diaris en la secreció d'hormones reguladores.

La insulina produeix una ràpida estimulació de la Δ^6 - i Δ^5 -dessaturases en rates diabètiques.⁴⁴⁶ Per contra, hormones hiperglicèmiques com el glucagó i les catecolamines produeixen una inhibició de les dessaturases per l'activació de l'adenilciclasa de la membrana plasmàtica a l'hepatòcit,^{65,127} inhibint síntesi de malonil-CoA.²⁷⁴ L'adrenalina també té un efecte antagònic al de la insulina sobre les dessaturases mitjançant pels receptors α -adrenèrgics.¹²⁸ Mentre que la inhibició produïda per esteroides és molt més lenta que les hormones citades anteriorment (inhibició màxima a les 24 hores) i sembla que involucri a mecanismes relacionats amb la síntesi proteica.¹²⁹

Components de la dieta com els hidrats de carboni i les proteïnes també actuen sobre l'activitat dessaturasa. En el primer cas, substàncies com la glucosa exerceixen una estimulació de la Δ^6 -dessaturasa quan és administrada després del dejú, probablement mediada per la insulina.^{60,126} Contràriament, l'administració continuada d'una dieta rica en glucosa disminueix l'activitat d'aquest enzim,³⁶¹ efecte observat també per la fructosa i el glicerol.¹³²

Les proteïnes tenen una important actuació sobre les dessaturases. En aquest sentit, dietes de restricció proteica provoquen una disminució de la relació C20:4n6/C18:2n6 en els lípids hepàtics,^{131,175,198,531} probablement com conseqüència

d'una reducció de l'activitat dessaturasa. Per contra, l'administració d'una dieta hiperproteica incrementa l'activitat Δ^6 -dessaturasa.³⁶⁰ Malgrat això, la ingesta de quantitats massives d'aminoàcids aromàtics produeix una inhibició de la Δ^6 -dessaturasa.³⁶²

Diversos micronutrients es troben involucrats al metabolisme dels AGPI. Alguns d'aquests com la vitamina E, el seleni i la vitamina C, són substàncies antioxidants que poden prevenir la peroxidació dels AGPI de membrana i evitar així lesions cel·lulars.^{205,456} Altres micronutrients, com Cu, Zn, i Fe, actuen com cofactors o grups prostètics de les dessaturases.^{118,119} Tant el Zn com el Fe estan íntimament relacionats en el metabolisme de la Δ^6 -dessaturasa, mentre que la Δ^9 -dessaturasa és Cu-depenent. Normalment, les situacions de dèficit d'AGPI essencials estan acompanyades de dèficit de Zn i, per tant, existeix una activitat Δ^6 -dessaturasa disminuïda, el que afavoreix una hiperactivitat Δ^9 -dessaturasa.^{118,119} Tanmateix, la deficiència de Fe produeix un descens de l'activitat Δ^6 -dessaturasa, el que es tradueix en un augment dels nivells plasmàtics i eritrocitaris d'àcid linoleic i una disminució d'AA als fosfolípids plasmàtics.^{118,119}

Els nucleòtids són altres components de la dieta que poden influir la síntesi d'AGPI. La presència de quantitats adequades de nucleòtids assegura una síntesi d'AGPI correcta. Estudis en lactants mostren que els nadons alimentats amb llet materna, rica en nucleòtids, o amb una fórmula làctica enriquida amb nucleòtids, presenten nivells més elevats d'AGPI $n6$ i $n3$ a les membranes dels eritròcits que els individus alimentats amb fórmula sense addició de nucleòtids.¹⁰²

3.2.3.2. Les elongases.

Es coneix relativament poc sobre l'elongació de la cadena per part de les elongases. Hi ha estudis que han mostrat l'existència d'una competència sobre les elongases per part de les diferents sèries d'AGPI de manera similar al que succeeix a les dessaturases. En aquest sentit, el procés d'elongació de C18:2 $n6$ a C20:2 $n6$, té

com inhibidor l'àcid α -linolènic (C18:3n3). Addicionalment, productes intermedis de la mateixa sèrie (AA) o productes finals d'altres sèries (EPA i DHA) tenen la capacitat d'inhibir aquest pas. Tanmateix, a l'afegir AGMI en cultius cel·lulars s'observà una disminució dels nivells d'AGPI per inhibició de les reaccions d'elongació.⁶⁷

També ha estat ben establert que l'activitat de les elongases és molt superior a la de les dessaturases i pràcticament igual per les sèries n3 i n6 d'AGPI.^{50,469,470} No obstant això, estudis on s'ha valorat el perfil hepàtic d'AGPI en rates han mostrat elevades quantitats d'AA, mentre que els nivells dels productes de la seva elongació estan clarament minvats (C22:4n6 i C22:5n6); contràriament, l'EPA (C20:5n3) està en nivells traça, sent l'DHA (C22:6n3) el component quantitativament més important de la sèrie n3. Aquesta diferent actuació de les elongases sobre la sèrie n3 *versus* n6 no és explicable per estudis d'activitat enzimàtica, el que suggereix l'existència d'un procés de retroconversió que escurçaria la cadena i que actuaria preferencialment sobre la sèrie n6.^{50,450,470}

La retroconversió és un procés catabòlic parcial poc conegut que sembla tenir lloc preferencialment als peroxisomes, sense descartar l'actuació de les mitocòndries, en el que intervenen una bateria enzimàtica diferent a la que actua en la β -oxidació i el seu objectiu no és el d'obtenir energia. Aquest procés implica que una part dels AGPI de 22 carbonis siguin metabolitzats a compostos de 20 carbonis i seguidament extrets del procés de β -oxidació amb el subseqüent increment d'AGPI C20 a la membrana plasmàtica.^{201,212}

Per finalitzar, tant sols resta dir que l'activitat de les elongases està sotmesa a la influència de factors dietètics com els hidrats de carboni, proteïnes, i fins i tot pel dejú, de la mateixa manera que ho estan les dessaturases.^{118,119}

3.3. ESTERIFICACIÓ I BIOSÍNTESI D'ACILGLICÈRIDS.

La majoria dels AG a les cèl·lules es troben formant èsters amb el glicerol, com els triacilglicerols (triglicèrids) i els fosfoglicerols (fosfolípids), que poden ésser considerats com els veritables productes finals de la biosíntesi d'AG. Per dur a terme els processos d'esterificació i biosíntesi, els AG han d'ésser activats prèviament amb CoA, mentre que el glicerol ha d'estar en forma de glicerol-3-fosfat.

3.3.1. Biosíntesi.

Existeix una gran especificitat en els enzims encarregats d'incorporar els AG dintre la molècula de glicerol-3-fosfat. La primera acilació està catalitzada pel glicerofosfat aciltransferasa i implica l'esterificació a la posició 1 del glicerol-3-fosfat (*sn-1*), preferentment, d'AG saturats (àcid palmític, àcid esteàric) i *trans*-AGMI. Mentre que l'enzim que catalitza la segona acilació, l'1-acilglicerofosfat aciltransferasa, és específic pels AGPI amb configuració *cis*, que són incorporats a la posició 2 del glicerol-3-fosfat (*sn-2*). El producte que s'obté és l'àcid fosfatídic o diacilglicèrid-3-fosfat, el qual és un intermediari comú per la síntesi de triacilglicèrids i fosfoglicèrids. El següent pas en la formació dels triacilglicèrids és l'extracció hidrolítica del grup fosfat del carboni 3 del glicerol per mitjà d'una fosfatasa, i posterior acilació catalitzada per la diacilglicèrid aciltransferasa que té molt menys especificitat i que pot introduir qualsevol tipus d'AG.

En la formació dels fosfoglicèrids, el fosfat no es perd sinó que s'uneix a un alcohol polar com és la colina, la serina, l'inositol i l'etanolamina, formant fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidiletanolamina, respectivament.

3.3.2. Deacilació i reacilació.

Com s'ha exposat anteriorment, tant els triacilglicèrids com els fosfoglicèrids tenen un origen comú, de manera que els AGPI en posició 2 estan determinats per l'especificitat enzimàtica de la 1-acilglicerofosfat aciltransferasa. Però, en el cas dels fosfolípids (fosfoglicèrids) apareix un major grau d'insaturació a l'AG que ocupa la posició *sn*-2 respecte als triacilglicèrids. Aquesta nova especificitat en el procés d'acilació dels AG als fosfolípids s'explica per l'existència d'una via que mitjançant la fosfolipasa A₂ (PLA₂) hidrolitza l'AG en posició *sn*-2 del fosfoglicèrid (Deacilació) i a continuació introdueix un segon AG amb un major grau d'insaturació per un procés de reesterificació (Reacilació).²²¹

No obstant això, aquest mecanisme és incapaç d'explicar els baixos nivells en què es troben els productes intermedis de l'elongació d'AG als fosfolípids i que posseeixen taxes similars d'acilació.²⁶³ Diferents observacions posteriors han suggerit l'existència d'un mecanisme que podríem denominar de "ping-pong" i, que en el cas de la sèrie n₆, consistiria en una primera dessaturació de C18:2n₆ a C18:3n₆ que seria acilat al fosfolípid i, a continuació, una ràpida extracció i posterior elongació a C20:3n₆, seguidament una nova esterificació el portaria a unir-se temporalment de nou amb el fosfoglicèrid abans d'ésser deacilat per introduir-hi una insaturació en posició 5 i donar finalment C20:4n₆ que s'unirà d'una manera més definitiva al fosfolípid.⁴⁷⁰ De totes maneres hi ha mecanismes diferents associats a la sèrie n₃, i que acumulen en els fosfolípids preferentment AGPI de 22 carbonis.²⁸⁹

Cas a part és el fosfatidilinositol que tant sols conté àcid esteàric i AA. Quan animals d'experimentació han estat alimentats exclusivament amb AG de la sèrie n₃, s'han detectat tant sols quantitats traça dels productes finals d'aquesta sèrie acilades al fosfatidilinositol.^{289,522} Aquest fenomen és probablement degut a l'existència d'algun enzim altament específic pel diglicèrid unit a l'AA que

d'aquesta manera preserva la funcionalitat del fosfatidilinositol com a missatger intracel·lular.²⁹⁷

3.3.3. Especificitats cel·lulars de la biosíntesi d'acilglicèrids

La membrana lipídica de les diferents cèl·lules de l'organisme estan caracteritzades per diferències en el perfil d'AGPI que el componen. Diferents experiments han evidenciat la limitada capacitat d'elongasa i d'elongasa d'algunes cèl·lules extrahepàtiques, suggerint que els AG provinents de la dieta són processats en primera instància pel fetge i a continuació desplaçats cap altres teixits.^{275,421} En aquest sentit, plaquetes i neutròfils mostren un elevat contingut d'AA i menor de productes AGPI de 22 carbonis, mentre que els cardiomiocits és caracteritzen per un elevat contingut d'AGPI de 22 carbonis de la sèrie n3. El que suggereix una diferent activitat d'elongasa/elongasa i de retroconversió a les diferents cèl·lules.^{67,252,325}

La font de C22:6n3 per la síntesi de fosfolípids al cervell i a la retina és objecte també de discussió. Mentre hi ha grups que han presentat evidències que suggereixen que C18:3n3 és metabolitzat pel fetge a C22:6n3 i transportat al cervell,⁴³⁷ altres grups han mostrat que cèl·lules endotelials aïllades dels capil·lars del cervell són capaces de metabolitzar C18:3n3 a AGPI de cadena llarga per la biosíntesi dels fosfolípids.³¹⁴

A les cèl·lules epitelials de la mucosa intestinal s'han identificat dues vies de síntesi de triacilglicèrids i fosfoacilglicèrids. La més important, des del punt de vista quantitatiu, és la "via del monoacilglicèrid" en la que els monoacilglicèrids es condensen amb dues molècules d'acil-CoA donant lloc a un triacilglicèrid o fosfoacilglicèrid. Els enzims implicats en aquest procés formen un complex multienzimàtic anomenat triglicèrid sintetasa que introdueix AG de cadena llarga a la posició 1 i 3. Aquesta via està restringida al teixit epitelial on s'associa al reticle endoplasmàtic llis, i través d'ella es realitza el 85%, aproximadament, de la síntesi

intestinal dels triacilglicèrids. La resta es sintetitza a través de la via ja esmentada del glicerol-3-fosfat i acil-CoA, que és comú per la majoria de teixits i similar a la biosíntesi fosfolipídica.³³³

CAPÍTOL 4. FUNCIONS DELS AGPI.

4.1. FUNCIONS ENERGÈTIQUES DELS AGPI.

El teixit adipós és el reservori més important d'emmagatzematge lipídic per l'obtenció d'energia. Els lípids estan en forma de triacilglicèrids que contenen una proporció d'AG saturats i monoinsaturats més elevada que en el cas dels fosfoacilglicèrids (funció estructural). La dieta pot alterar aquestes proporcions d'AG esterificats. De fet la ingesta de dietes riques en àcid linoleic (C18:2n6) o en -linolènic (C18:3n3) fan augmentar el contingut d'aquests i dels seus productes intermedis/finals (AA, EPA, DHA) als triacilglicèrids plasmàtics i del teixit adipós.^{161,278}

Els AG són mobilitzats al teixit adipós atenent a la demanda energètica de l'individu en cada moment. Aquesta extracció energètica està regulada per factors hormonals i dietètics amb estreta relació a les situacions de dèficit energètic. La mobilització dels dipòsits d'AG comporta un augment d'aquests en sang on s'acomplexen amb l'albumina i posteriorment passen a l'interior de la cèl·lula on seran metabolitzats a la mitocòndria pel procés anomenat -oxidació alliberant energia en forma d'ATP.

Diferents tipus d'AG poden ser oxidats per aquest procés catabòlic. Malgrat això, els AG essencials semblen desvinculats d'aquest procés, possiblement per preservar intactes les capacitats fisiològiques associades a la membrana plasmàtica.⁶⁶

La mitocòndria és l'òrganul que conté la bateria enzimàtica necessària per portar a terme la -oxidació. L'entrada dels AG dins la matriu mitocondrial es deu a un sistema transportador que requereix la formació d'un èster de l'AG amb la

carnitina. Una vegada dintre, l'AG s'activa en forma d'acil-CoA i és canalitzat cap a les vies metabòliques d'esterificació o oxidació. És en aquest darrer cas on els AG són sotmesos a un catabolisme oxidatiu que consisteix en una pèrdua progressiva d'unitats de dos carbonis a partir de l'extrem carboxílic de l'acil-CoA. Aquest procés es coneix per β -oxidació, perquè, prèviament al trencament de la molècula d'acil-CoA, entre els àtoms de carboni 2 i 3 es produeix l'oxidació del carboni α , així l'acil-CoA es transforma a *trans*-2,3-enoil-CoA.¹⁸⁶ L'oxidació completa d'un acil-CoA (amb un número parell de carbonis) requereix la participació de quatre enzims que actuen seqüencial i repetidament, de manera que a cada cicle l'acil-CoA perdrà un acetil-CoA que s'integra en el cicle dels àcids tricarboxílics (β -oxidació en espiral).¹⁸⁶ L'estequiometria de l'oxidació dels AG es pot resumir prenent com exemple l'àcid palmític:



Els peroxisomes també són un important lloc d'oxidació d'AG, particularment pels AG de cadena més llarga i amb un major grau d'insaturació, a més dels AG hidroxilats i de cadena ramificada.³⁵¹ Algunes cèl·lules realitzen fins un 30% del procés oxidatiu als peroxisomes.²⁰¹ La α -oxidació peroxisomal genera H_2O_2 , aquest és un dels motius pels que aquest mecanisme està adquirint certa rellevància degut al paper del radical peròxid davant la peroxidació lipídica que s'associa a diversos processos patològics.^{195,262}

4.2. AG I EL PAPER ESTRUCTURAL A LA MEMBRANA.

L'evolució ha comportat l'aparició d'un ampli rang de membranes que doten d'estructura, distribució de metabòlits i compartimentació de funcions a les cèl·lules. Això ha contribuït al desenvolupament de la cèl·lula eucariòtica i a l'especialització dels teixits. Les membranes plasmàtiques separen la matriu cel·lular del medi extern, formen el reticle endoplasmàtic i són la base estructural dels diferents orgànuls intracel·lulars.

Les biomembranes reflecteixen principalment les propietats fisicoquímiques dels fosfolípids: un marcat caràcter hidrofòbic per la doble cadena alifàtica (>75% de pes molecular), i el cap hidrofílic (que conté el grup fosfat i el grup alcohol). D'aquesta manera, els fosfolípids s'associen espontàniament en forma de bicapa amb les cadenes acilades d'AG a l'interior i la part polar encarada al medi extern i al citoplasma. Aquesta bicapa fosfolipídica pot permetre la inclusió d'altres molècules lipofíliques com el colesterol, els esfingolípid i proteïnes. La membrana plasmàtica de les cèl·lules eucariotes poden arribar a contenir més de 10^3 diferents espècies de fosfolípids, el que suggereix que a més de la funció de barrera els fosfolípids poden estar relacionats amb tot un seguit de funcions cel·lulars.⁵⁰⁹

En Singer i Nicolson (1972) proposaven un model de mosaic fluid, segons les propietats esmentades, i en el que la bicapa lipídica incloïa proteïnes intramembranoses, tot i que mostrava alguna mancança alhora d'explicar l'accessibilitat d'alguns enzims al substrat.⁴⁵⁴ Actualment, diferents formes d'unió entre la biomembrana i les proteïnes han estat descrites, diferenciant entre proteïnes unides per forces electrostàtiques a la cara interna de la membrana i proteïnes, que pel seu caràcter dominat hidrofòbic, estan totalment englobades o creuant la totalitat de la biomembrana. A més, tant els components lipídics com proteínics estan dotats de moviment lateral. Lípids i proteïnes mostren una considerable variabilitat a les membranes cel·lulars, el que està relacionat amb l'elevada diversitat funcional de les cèl·lules.¹⁶²

4.2.1. Lípids a la membrana plasmàtica.

Els glicerofosfolípids són la principal forma lipídica present a les membranes plasmàtiques i als diferents òrgans cel·lulars. Observacions en fetge de rata han mostrat que la composició lipídica de la membrana plasmàtica és 1.8, 23.1, 43.1, 6.5, 3.7, i 20.5% de lisofosfatidilcolina, esfingomielina, fosfatidilcolina,

fosfatidilinositol, fosfatidilserina, i fosfatidiletanolamina, respectivament.¹⁶² Sent els esfingolípids, glicoesfingolípids i gangliòsids components habituals de la zona apical de les membranes plasmàtiques dels enteròcits.¹⁶² El colesterol sol estar integrat a les membranes intracel·lulars, particularment a l'aparell de Golgi i a les seves vesícules de secreció.

La presència d'AG insaturats a les cadenes alifàtiques dels fosfolípids aporta diferències estructurals i funcionals a les cèl·lules. Així, cadenes amb un alt contingut d'AG saturats mostren una elevada força d'unió entre elles, traduint-se en un descens de la fluïdesa. Per contra, l'aparició d'un major nombre d'AGMI fan augmentar la fluïdesa, ja que per una banda augmenta l'espai que ocupa la cadena, i per altre, les forces d'unió són menors entre les cadenes.⁶⁶ No obstant això, l'augment d'insaturació no implica una relació lineal amb un augment de fluïdesa. L'aparició d'un augment màxim de fluïdesa ve donat per la presència d'un grau mitjà d'insaturació, a partir del qual, la fluïdesa torna a minvar. Això és degut pels AG amb elevat grau d'insaturació adopten una configuració helicoida, el que permet un major grau d'empaquetament.⁴⁸¹ La presència de colesterol també fa la membrana plasmàtica més rígida per l'efecte condensador sobre les cadenes acilades dels fosfolípids.⁵⁰⁹

Les molècules lipídiques poden ser intercanviades d'una manera ràpida amb les seves veïnes, però rarament migren d'una monocapa a l'altre. Tant sols en el cas d'una transmetilació induïda per factors reguladors sistèmics o locals, es poden afectar els fosfolípids de la monocapa interna, els quals transloquen a la monocapa externa induint canvis conformacionals sobre alguna proteïna associada a la membrana, aquest fet pot estar relacionat en el desenvolupament d'alguna patologia autoimmune.³³⁷

D'altra banda, la fluïdesa de la biomembrana facilita la difusió lateral de les molècules lipídiques, d'agregats, i de grups específics de fosfolípids que poden estar associats a proteïnes particulars. També les proteïnes de la membrana es

beneficien d'aquest moviment lateral, a més d'un moviment rotacional sobre el seu propi eix.

En general, els diferents tipus de membranes cel·lulars contenen diferents composicions fosfolipídiques que adopten una disposició asimètrica a la bicapa. A més, fosfolípids que contenen colina (fosfatidilcolina, esfingomiosina) i glicolípid es localitzen preferentment a la capa externa de la membrana, mentre que fosfatidilinositol i fosfatidilserina ocupen preferentment la capa citosòlica de la membrana.⁵⁰⁸ Aquesta distribució selectiva suggereix conseqüències funcionals que podrien estar relacionades amb la unió proteica a la monocapa interna o externa de la membrana, i amb mecanismes de regulació de les concentracions catióniques. De fet, la disposició de fosfolípids específics a la monocapa interna podria reflectir els requeriments metabòlics de les proteïnes (enzims o receptors).²⁴⁵ El procés pel que es produeix aquest emplaçament selectiu dels fosfolípids no es coneix amb precisió, però algunes evidències apunten a l'actuació de l'Aparell de Golgi o a l'acció d'algunes proteïnes que reemplacen els fosfolípids a la capa externa mitocondrial.²⁴⁵ En línies generals, els components lipídics de la membrana plasmàtica són usualment encaixats al reticle endoplasmàtic on hi ha els enzims per la biosíntesi *de novo* dels fosfolípids. A continuació, els fosfolípids són translocats a la cara interna de la membrana de les vesícules microsomals. El transport d'aquestes vesícules acaba amb la fusió d'aquestes a les diferents localitzacions de la membrana, i per tant, incloent-í hi els fosfolípids.

Un altre paràmetre que introdueix una nova especificitat de transport i d'emplaçament és la unió dels fosfolípids a proteïnes, tant de forma específica com inespecífica.²⁸⁰ En aquest sentit, una proporció significativa de les proteïnes (5'-nucleosidasa, fosfatasa alcalina, fosfodiesterasa, CD4, TH-1...) estan allotjades a la monocapa externa cel·lular via enllaços covalents amb glicofosfatidilinositol.⁵¹⁹ El més rellevant de l'unió fosfolípid-proteïna és quan es relaciona amb els senyals transmembrana reguladores dels segons missatgers.²⁸⁵

Un dels mecanismes que influeix sobre la composició dels AG de la membrana és la composició lipídica de la dieta, tot i que és menys susceptible que en el cas dels AG que formen part del reservori energètic. En els darrers anys s'han estudiat amb especial interès la modificació de la composició dels AG a través de la dieta, particularment dels AGPI de les sèries n3 i n6. Els canvis observats no sempre són fàcilment interpretables en termes que reflecteixin directament l'activitat dessaturasa i elongasa.⁴⁶⁹

Lleugers canvis en la composició dels AG que formen la part hidrofòbica dels fosfolípids poden esdevenir en importants alteracions en les propietats de la membrana. Això es fa especialment significatiu pels AGPI associats als fosfoglicèrids. En aquest sentit, la substitució de C20:3n9 per C20:4n6 genera una membrana menys compacta i amb més permeabilitat als ions.¹⁵³ D'altra banda, la substitució de l'AA per EPA té marcats efectes sobre la producció d'eicosanoides.^{200,234,272} No obstant això, a la literatura apareixen descrites alteracions, independents de la producció d'eicosanoides, sobre la fagocitosi, endocitosi, exocitosi i la resposta immunològica influïdes per canvis de la natura lipídica a la membrana cel·lular.^{83,84,245,435,460,466,483,509} Per tant, aquestes troballes suggereixen que la modificació lipídica pot exercir una important influència en el curs de malalties autoimmunes o de resposta immunitària, càncer i fenòmens inflamatoris.

El dèficit d'AG essencials comporta una incapacitat de síntesi o manteniment de la membrana cel·lular. Apareixent una tendència a la deshidratació cel·lular per augment de la permeabilitat de les membranes i del metabolisme basal.³⁰³ El que comporta l'aparició de patologies com la dermatitis escamativa, retards del creixement, pèrdua del cabell, hipopigmentació, hipotonia muscular i necrosi de la cua d'alguns animals.²⁰⁷

4.2.2. Interaccions lípid-proteïna i funció cel lular.

Tal i com he esmentat anteriorment, en línies generals poden distingir-se dos tipus de proteïnes de membrana, les que estan lleugerament unides a aquesta per forces electrostàtiques i que poden ser fàcilment extretes per manipulació iònica (extrínseques o perifèriques), i les que es troben ancorades, total o parcialment, a la bicapa lipídica (intrínseques). Aquest darrer cas és el més predominant entre les proteïnes de membrana, i en el que apareixen regions proteïques amb un alt contingut d'aminoàcids apolars que es disposen ocupant l'espai intramembranós de la bicapa lipídica, mentre que les regions polars són exposades a la cara interna o externa de la membrana. En alguns casos la regió polar d'aquestes proteïnes es troba glicosilada, alhora que la regió hidrofòbica s'expandeix a l'interior de la bicapa, generalment en conformació alfa. La majoria d'aquestes proteïnes estan involucrades a la presentació d'antígens de superfície.

Les proteïnes intrínseques poden incrementar la viscositat de la membrana lipídica, modificant l'ordre de les cadenes alifàtiques dels fosfolípids que l'envolten. Els lípids que ocupen aquesta interfase lípid-proteica, experimenten unes propietats fisicoquímiques diferents a la resta dels lípids de la membrana, sent la seva consistència més gelatinosa. Aquests lípids donant lloc a interaccions lípid-proteïques molt més fortes que les interaccions lípid-lípid.^{276,370} S'ha suggerit que els lípids que envolten a les proteïnes aporten un microambient adient per la idònia conformació proteica, i per tant, qualsevol alteració lipídica possiblement pugui regular la funció proteica.^{370,482} En canvi, evidències recents han suggerit que les interaccions lípid-proteïques són relativament inespecífiques. Fent palès el manteniment de la funció proteica independentment a l'unió amb els fosfolípids.^{245,509}

Els canvis de viscositat a la membrana cel lular determinen canvis d'orientació, mobilitat i conformacionals a les proteïnes. Per tant, poden aparèixer influències sobre proteïnes clau per la funció cel lular.⁴⁶⁶ No obstant això, aquestes influències

no deixen de ser complexes. En aquest sentit, hi ha estudis on l'augment d'insaturació dels AG mostren un augment en l'activitat en enzims de membrana com els citocroms *c*, *c*₁, *a*₃, adenilat ciclasa i 5-nucleotidasa.²⁴⁵ Contràriament, altres estudis mostren com Mg:ATPasa i γ -glutamil transferasa romanen inactivats davant l'augment de fluïdesa de la membrana.⁴⁶⁶ Mentre que enzims com la fosfolipasa A₂ tenen l'activitat més elevada a la zona de transició entre l'àrea gelatinosa i la zona més fluïda.²⁴⁵

Una altra de les funcions cel·lulars que es poden veure afectades per l'influència lipídica és la del transport, concretament les proteïnes que constitueixen els canals o porus a través dels quals hi ha pas d'aigua, anions, cations i substàncies no electrolítiques. El mecanisme d'actuació es basaria en el canvi de la conformació espacial de la proteïna degut a un canvi de la viscositat.³⁰³

Estudis realitzats per avaluar l'efecte de l'alteració de la composició lipídica de membrana sobre receptors hormonals de determinats tipus cel·lulars, han evidenciat que davant un increment del contingut d'AGPI en les cèl·lules s'incrementa el nombre de receptors de superfície per la insulina, malgrat la pèrdua de capacitat de captació d'aquests receptors.⁴⁶⁶

De tots els exemples exposats de les interaccions lípid-proteïna no es poden extreure generalitzacions que ens permetin predir l'actuació d'un determinat sistema davant un tipus específic de modificació lipídica. Tampoc existeix una evidència inexorable que la funció de membrana depengui d'interaccions selectives AG-proteïna. A més, s'ha suggerit que altres AG insaturats derivats de les sèries n7 i n9 poden proporcionar el nivell de fluïdesa adequat pel manteniment de les funcions de membrana.²⁶⁴ Aquestes dades recolzen la hipòtesi que l'essencialitat de l'àcid linoleic i γ -linolènic es basa en funcions pròpies del seu metabolisme (p.ex.: biosíntesi d'eicosanoides) i no en el manteniment estructural de la membrana ni en les interaccions selectives lípid-proteïna.

4.2.3. Distribució intracel·lular dels AG.

Hi ha tot un seguit de proteïnes citoplasmàtiques que estan relacionades amb la distribució d'AG de la membrana a altres compartiments intracel·lulars. Aquestes proteïnes tenen una estructura que permet transportar molècules hidrofòbiques.⁴²⁵ Sent la principal funció reequilibrar l'excés d'AG que poguï acumular la cèl·lula.

Dintre d'aquesta família de proteïnes es poden distingir dos tipus, una present als enteròcits i l'altre als hepatòcits.¹⁰⁰ Ambdós tipus cel·lulars estan sotmesos a un gran flux d'AG a través de la membrana i del citoplasma. Recents estudis han mostrat que la capacitat de captació de molècules d'AG per aquestes proteïnes oscil·la entre 1 a 3 mols per molècula proteica, i que, tant aquestes com la membrana plasmàtica, tenen similar afinitat pels AG.¹⁰¹ En canvi, la membrana pot mantenir més quantitats d'AG per massa que les proteïnes transportadores.

4.3. AG COM SEGONS MISSATGERS.

La capacitat dels AG d'actuar sobre el comportament cel·lular no es basa tant sols amb funcions estructurals o energètiques. El descobriment que alguns AGPI podien esdevenir importants molècules bioactives, com els eicosanoides, feien pensar que els AG podien exercir un control metabòlic a través de la membrana plasmàtica via la formació de metabòlits lipídics bioactius.

Actualment, hi ha coneixement d'un ampli ventall d'espècies lipídiques bioactives referides com a segons missatgers. La majoria d'aquests compostos són obtinguts per l'alliberament dels AG a partir dels fosfolípids per diverses fosfolipases, seguit d'un metabolisme de transducció de senyals.

4.3.1. Mecanismes de transducció de senyals relacionats amb els lípids.

El concepte de senyal de transducció actualment ha estat redefinit, si més no, en un intent d'incloure totes les múltiples modalitats metabòliques que integren els processos de producció de metabòlits secundaris amb capacitat bioreguladora i la interconversió entre diferents segons missatgers lipídics. En general, la transducció de senyals via l'acció de segons missatgers lipídics respon, en primera fase, a l'estimulació d'un receptor que activa la formació d'un missatger (primera onada), i aquest, a la vegada, pot intervenir en la mobilització d'un altre missatger (segona onada). L'assignació de missatger lipídic de "primera onada" o de "segona onada" depèn del context cel·lular i de l'acció que inicialitzen; per exemple, el cas de la producció de diacilglicèrid (DAG) per la fosfolipasa C (PLC) pot ser regulat directament pel receptor del factor de creixement epidèrmic, o bé, pot ser secundari a l'estimulació de la producció d'AA.²⁸¹

Els estímuls extracel·lulars o intercel·lulars (hormones, factors de creixement, neurotransmisors, antígens, citocines,...) s'uneixen a receptors específics, generalment de membrana, provocant l'activació de tot un seguit d'esdeveniments a través de l'activació de fosfolipases específiques, i que finalitzen amb la fosforilació d'una proteïna que comporta una alteració en les propietats fisiològiques de la cèl·lula (**figura 4.1**).

L'activació de receptors de la membrana pels agonistes comporta la transducció d'aquests senyals per molècules localitzades a la capa interna de la membrana. La família de proteïnes G estan involucrades en aquest procés. Aquestes proteïnes tenen una estructura heterotrimèrica (amb les subunitats α , β , γ) i perden afinitat entre elles quan el receptor s'activa, unint-se la subunitat α al GTP. El complex G - GTP té capacitat de fosforilar de forma reversible a altres macromolècules com l'adenilatciclasa que genera adenosina monofosfat cíclic (segon missatger universal). L'estat activat de la proteïna G pel complex G -GTP té capacitat

GTPasa, això implica el retorn d'aquest complex a la forma inactiva (G -GDP), i per tant, el final de l'estimulació.^{245,333,480}

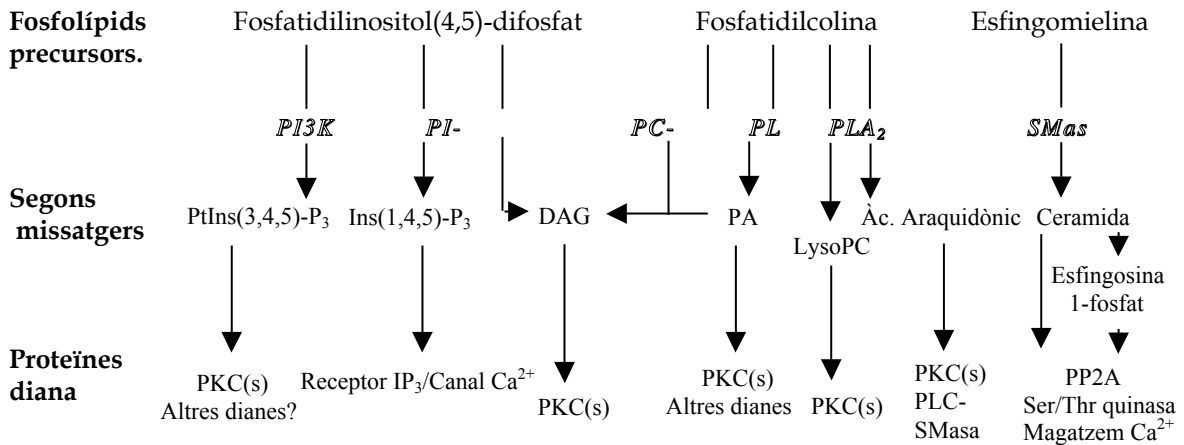


Figura 4.1.: Vies metabòliques de transducció de senyals portades a terme per lípids. Abreviacions: fosfolipasa C específica pel fosfatidilinositol (PI-PLC); fosfolipasa C específica per fosfatidilcolina (PC-PLC); Fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K); fosfolipasa D (PLD); fosfolipasa A₂ (PLA₂); Esfingomielinasa (SMasa); fosfatidilinositol-(3,4,5)-trifosfat (PtIns-(3,4,5)-P₃); Inositol-(1,4,5)-trifosfat (Ins-(1,4,5)-P₃ o IP₃); diacilglicèrid (DAG); àcid fosfatídic (PA); lisofosfatidilcolina (LysoPC); proteïna-quinasa C (PKC); fosfatasa 2A (PP2A).²⁸¹

Les PLC ocupen la monocapa interna de la membrana plasmàtica. Hidrolitzen tant el fosfatidilinositol difosfat com la fosfatidilcolina generen l'Ins (1,4,5)-P₃ (IP₃) i el DAG.²⁴⁵ Es poden distingir tres famílies d'aquesta fosfolipasa: PLC- α , PLC- β i PLC- γ , les quals són regulades per mecanismes diferents. Tots els isoenzims de la família de la PLC- són activats per la proteïna G. Concretament, la PLC- α està activada per la subunitat G_{12} , mentre que la PLC- β és sensible a qualsevol de les tres subunitats.²⁸¹ L'activació de la PLC- β requereix l'unió d'aquesta amb un receptor amb capacitat autofosforilativa.^{15,16} En el cas de la PLC- γ , no es coneix com s'activa, tant sols se sap que a concentracions a nivell μ molar de Ca²⁺ i amb presència d'AGPI l'enzim roman actiu.²⁸¹ La PLC- γ hidrolitza específicament el fosfatidilinositol constituint l'isoenzim clau en el cicle de l'IP₃. Estudis en humans i amb animals d'experimentació induïts amb carcinògens han mostrat una sobreexpressió temps dependent de la PLC- γ en teixit tumoral colònic.^{224,339,355,395} També s'ha suggerit que la producció d'àcids biliars secundaris, com a conseqüència de la interacció dels greixos amb el metabolisme bacterià, activa

senyals intracel·lulars a través de l'estimulació de la PLC- β ,⁴⁰³ el que podria ser un mecanisme per explicar l'efecte pro-carcinogènic dels àcids biliars.

L'acció de la família enzimàtica citosòlica de les PLA₂ (cPLA₂) produeix AA i lisofosfatidilcolina a partir de substrats com la fosfatidilcolina o fosfatidilinositol. Dintre d'aquesta família de fosfolipases trobem formes amb diferent pes molecular (de 28 a 85 kDa) i amb diferent sensibilitat pel Ca²⁺. Addicionalment, malgrat el sobrenom de citosòliques, alguns subgrups poden actuar extracel·lularment com les anomenades PAF-hidrolases. En general, les cPLA₂ necessiten Ca²⁺ a concentracions μ M per poder unir-se a les membranes de diferents orgànuls intracel·lulars on són totalment actives. Aquesta unió a les membranes intracel·lulars és conseqüència de l'estimulació d'agonistes com IL-1 i TNF, i per l'acció fosforilativa de diverses quinases.^{103,281,441} D'altra banda, malgrat l'existència de cPLA₂ amb capacitat d'extreure àcid oleic dels fosfolípids,³³⁵ la majoria d'aquestes fosfolipases extreuen de forma selectiva AA.^{245,281}

L'activitat de la PLA₂ està augmentada a la mucosa de rates induïdes amb AOM comparat amb rates control; addicionalment, l'ingesta d'altres quantitats de greix provoca un augment encara més elevat l'activitat PLA₂, probablement per una elevació en la producció d'àcids biliars secundaris.³⁹⁵

Un altre tipus de PLA₂ són les formes segregades (sPLA₂). Aquestes, no presenten cap regió homologa amb la forma cPLA₂, tenen un pes molecular de 14kDa i necessiten Ca²⁺ com cofactor.³³⁵ A diferència de les formes citosòliques, les sPLA₂ exerceixen exclusivament aspectes funcionals a l'espai extracel·lular, on són segregades en forma de proenzims a partir de macròfags i plaquetes. L'activitat enzimàtica d'aquestes fosfolipases secretades dona lloc a l'extracció d'AA de les membranes plasmàtiques de cèl·lules adjacents, el que nodreix les vies metabòliques oxidatives a la inflamació.^{23,408} Estudis en humans i en animals d'experimentació han associat l'alliberament d'AA per part de la sPLA₂ com la

principal via de producció de la prostaglandina E₂ (PGE₂) durant la tumorigènesi colònica.^{238,315,487}

L'AA no esterificat és el precursor dels eicosanoides, però alhora es troba involucrat en una sèrie de vies metabòliques independents de la formació d'eicosanoides i amb una clara funció de segon missatger *per se*. Hi ha evidències on s'ha demostrat la capacitat de l'AA d'activar la PLC- β , PLC- γ , esfingomielasa, l'adenilatciclasa i la guanilatciclasa.^{220,245,281} També s'ha descrit un efecte activador sobre les PKC per part de l'AA, concretament sobre els isoenzims PKC- α , - β , i - δ .^{321,447} Contràriament al que succeeix per part de certs AGPI, especialment de la sèrie n₃, amb capacitat d'inhibir la PKC.⁴⁶³ A més, l'acumulació d'AA no esterificat al citoplasma de cèl·lules cancerígenes s'ha relacionat amb un augment de l'apoptosi.^{89,93}

La PLD allibera un alcohol polar (colina, serina o inositol) i l'àcid fosfatídic a partir dels fosfolípids. L'àcid fosfatídic no tant sols és un intermediari comú a la síntesi de triacilglicèrids i fosfoglicèrids, sinó que també es caracteritza pel seu comportament com a segon missatger. A més, l'àcid fosfatídic és interconvertible amb el DAG per mitjà de l'àcid fosfatídic-fosfatasa i DAG-quinasa. El substrat principal de la PLD és la fosfatidilcolina, però a l'igual que la PLC, també té capacitat de trencar els glicofosfatidilinositol que uneixen proteïnes a la monocapa externa de la membrana plasmàtica cel·lular.^{281,307} Estudis recents en cultius de cèl·lules tumorals colòniques han evidenciat que l'activació de PLD pot ser duta a terme per la PKC- β , pel factor ribosilador de l'ADP o per complexos proteïnics G dependents.^{239,240} Estudis amb animals d'experimentació han relacionat l'augment d'activitat de la PLD amb processos neoplàssics colònics com la hiperproliferació.⁵⁴¹

4.3.2. PAF i l'àcid lisofosfatídic.

PAF i àcid lisofosfatídic pertanyen a la subclasse de segons missatgers lipídics intercel·lulars (inclosos els eicosanoides). Aquests metabòlits bioactius són

generats a partir de l'activació de plaquetes, neutròfils, eosinòfils, monòcits/macròfags, i cèl·lules endotelials, però no pels limfòcits,²⁴⁵ per l'acció de la PLA₂. Actuen transmeten senyals a través de receptors proteínics de membrana units a les proteïnes G.²⁸¹ L'àcid lisofosfatídic s'ha relacionat amb la formació i/o reparació de filaments d'actina i a l'activació de la via Ras/Raf/MEK/MAPK.²⁸¹ Mentre que el PAF exerceix els efectes biològics a través de receptors que estimulen la PKC i augmenten la concentració de Ca²⁺ intracel·lular.²⁸¹

El PAF (1-alkil-liso-2-hidroxicglicerol-3-fosfolina) és un anàleg a la fosfatidilcolina sintetitzat a partir de la lisofosfatidilcolina. Una vegada format, pot romandre associat a la membrana cel·lular el que possiblement augmenta el nivell de resposta davant d'un agonista.⁴⁶ La seva producció, concomitant a la de l'AA, s'ha associat a l'agregació i desgranulació plaquetar i a l'estimulació dels neutròfils fomentant els fenòmens d'adhesió i fagocitosi al focus inflamatori.¹⁴³ Addicionalment, l'adhesió entre cèl·lules carcinogèniques colòniques i cèl·lules endotelials estimulades també s'ha vist incrementada per acció del PAF, possiblement via E-selectina.²⁸¹ L'activitat biològica del PAF juga un important paper a la patogènia de l'anafilaxi i inflamació, augmentant la permeabilitat vascular i induint hipotensió i contracció del múscul llis.²⁴⁵ A més, pot induir úlceres a la mucosa gàstrica normal i hemorràgia per shock sèptic.⁴¹⁹ L'extracció de PAF per part dels leucòcits o cèl·lules endotelials humanes pot ser suprimida per la suplementació dietètica d'EPA.⁴⁶⁷

En els darrers anys s'han purificat una fracció d'enzims que pertanyen a la família Ca²⁺-independent de les PLA₂ que circulen pels espais intercel·lulars i tenen capacitat d'inactivar el PAF i altres fosfolípids oxidats que provenen de membranes plasmàtiques. D'aquesta manera, aquests enzims, anomenats PAF-hidrolases, posarien terme als senyals irritants provinents de processos oxidatius.^{245,281}

4.3.3. Missatgers derivats d'esfingolípids.

L'hidròlisi dels esfingolípids ha estat reconeguda com una font de segons missatgers lipídics putatius de cadena llarga davant l'estimulació de l'esfingomielinasa.³⁴⁵ Els productes obtinguts d'aquesta reacció són la ceramida i l'esfingosina.

L'estimulació per part de la vitamina D₃, TNF , IFN- , IL-1, i dexametasona de l'esfingomielinasa provoca un augment de la ceramida per un mecanisme que pot involucrar en primera instància l'extracció d'AA per part de la PLA₂ i que esdevé en l'activació de Serina/Treonina quinases i la fosfatasa 2A.^{192,220} Estudis amb inhibidors del metabolisme ciclooxigenàsic en cèl·lules tumorals colòniques evidencien una acumulació citoplasmàtica d'AA, el que estimula la conversió de l'esfingomielinina a ceramida, la qual, a la vegada, estimularia l'apoptosi per activació d'algunes quinases.⁹³

Estudis *in vitro* han mostrat que l'esfingosina o l'esfingosina-1-fosfat estan relacionades amb tot un seguit de senyals de transducció basades en la inhibició de la PKC.¹⁹¹ Concretament, l'esfingosina pot intervenir en processos cel·lulars de defensa (activació de plaquetes, neutròfils i cèl·lules *natural killer*), en l'activitat citosòlica sobre patògens, en l'expressió de gens virals, en el creixement i diferenciació de diverses línies cel·lulars, en el control sobre varis mecanismes de transport d'ions i sucres i en la resposta neuronal a diferents productes estimuladors.^{306,307} A més, l'esfingosina pot interferir la promoció tumoral per la capacitat d'inhibir la PKC i l'ornitina descarboxilasa.¹⁵⁰

4.3.4. Cicle del fosfatidilinositol com a promotor de segons missatgers.

El fosfoinositol (4,5)-difosfat (PIP₂) es troba allotjat a la cara interna de la membrana plasmàtica on s'ha format a partir de la fosforilació del fosfatidilinositol. L'acció d'un agonista extracel·lular origina l'activació de la PLC-

a través d'un receptor G específic. Aquest enzim unit a la membrana hidrolitza l'enllaç fosfodiester que uneix l'inositol amb el glicerol acilat generant dos importants segons missatgers de vida curta: IP_3 i el DAG. L' IP_3 va exhaurint gradualment el seu potencial com a segon missatger per l'acció seqüencial d'una sèrie de tres inositol-fosfatases que provoquen la pèrdua de grups fosfat. D'altra banda, la fosforilació del DAG dóna lloc a l'àcid fosfatídic, el qual reacciona amb citidina trifosfat (CTP) formant CDP-DAG que acaba unint-se a l'inositol produint CMP i fosfatidilinositol, finalment el fosfatidilinositol per l'acció consecutiva de dues ATP-quinases es regenera de nou a PIP_2 . Alternativament, el DAG pot ser hidrolitzat formant monoacilglicèrid i un AG constitutiu que ocupa la posició sn-2 (normalment l'AA) (**figura 4.2**).^{66,480}

No tot l' IP_3 és desfosforilat. Existeix un mecanisme enzimàtic estimulat per la presència de Ca^{2+} citoplasmàtic que pot fosforilar la molècula de IP_3 produint inositol 1,3,4,5-tetrafosfat. Aquest mecanisme està associat a respostes més sostingudes i al manteniment de la concentració intracel·lular de Ca^{2+} . Addicionalment, l'actuació d'agonistes com el factor de creixement epitelial provoca l'activació de la PLC- per la capacitat fosforilativa dels receptors.^{15,16} L'acció d'aquest enzim sobre el PIP_2 també dóna l'inositol 1,3,4,5-tetrafosfat. Consecutivament, l'inositol tetrafosfat serà hidrolitzat seqüencialment, generant en primera instància 1,3,4-trifosfat, isòmer de l' IP_3 , relacionat principalment amb alteracions psicològiques.^{66,480}

A la majoria de cèl·lules, el PIP_2 és l'espècie de fosfatidilinositol que primer es trenca per l'acció dels agonistes, però en algunes cèl·lules com les plaquetes, musculatura lliça, cèl·lules T, i fibroblasts, la fosfatidilcolina pot mostrar tanta o més afinitat per intervenir com a substrat en aquest procés.²⁴⁵

L' IP_3 provoca un ràpid alliberament del Ca^{2+} dels reservoris intracel·lulars i probablement faciliti l'entrada d'ions de calci extracel·lulars a l'interior de la cèl·lula.^{38,66,480} Els nivells citoplasmàtics elevats de Ca^{2+} desencadenen

posteriorment processos com la contracció de la musculatura lliça, la ruptura del glucogen, i la divisió cel·lular.⁴⁸⁰

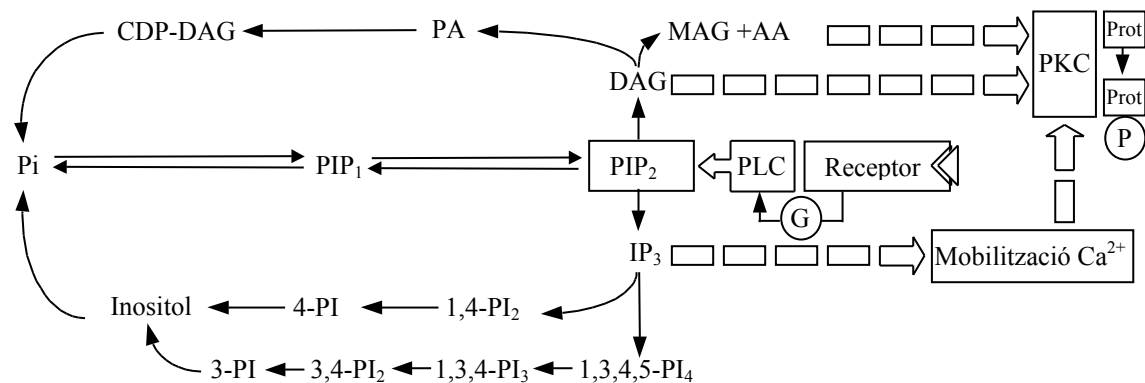


Figura 4.2.: Cicle d'inositol i Diacilglicèrid. Generació de diferents senyals de transducció.

Estudis amb substàncies que mimetitzen per separat les accions del DAG (èsters de forfol) i del IP₃ (ionòfors de calci) han suggerit la col·laboració d'ambdues branques del cicle de l'inositolfosfat en l'activació d'algunes isoformes de PKC.^{245,281,447} Concretament, el DAG augmentaria l'afinitat de les PKC pel Ca²⁺, mentre que l'increment de Ca²⁺ per part de IP₃ facilitaria la translocació d'aquestes quinases a la cara interna de la membrana cel·lular on romanen inactius.

El procés de transformació oncogènica al colon s'associa a una acumulació inicial de DAG intracel·lular, tal i com s'observa en els models experimentals de rates induïdes amb carcinògens, el que activaria de forma temps dependent les PKC.²²⁴ A més, la formació de DAG i àcids biliars secundaris per la microflora intestinal poden intervenir en la carcinogènesi colònica possiblement a través de l'activació de vies de transducció de senyals que involucren l'activació de fosfolipases i PKC.^{369,395,403}

4.3.5. PKC: exemple de proteïna diana efectora.

Un dels requeriments bàsics per poder definir a una molècula com a segon missatger és la identificació de la diana intracel·lular. Aquest és el cas de diferents

enzims fosforilatius entre els que hi destaca la família de les PKC, integrada per 11 isoenzims i que constitueixen la principal diana dels segons missatgers d'origen lipídic. Actualment, es poden diferenciar tres grups de PKC: les Ca²⁺-dependents (, I, II,); les Ca²⁺-independents (, , , , μ); i les PKCs atípiques (, /), les quals són Ca²⁺-independents i, a diferència de les altres, no són activades ni pels èsters de forfol ni pel DAG.^{133,335}

Malgrat que el DAG és el principal activador de la majoria d'isoenzims de PKC, altres lípids provinents de la membrana plasmàtica mostren una elevada capacitat reguladora d'aquests enzims. En aquest sentit, destaquen la lisofosfatidilcolina, l'àcid fosfatídic, l'AA, l'àcid oleic i productes provinents de l'actuació de PI₃-quinasa, els quals actuen en més o menys especificitat sobre les diferents PKC.^{16,34,245,281,320,447} S'ha descrit una regió rica en cisteïna amb dos àtoms de zinc que poden mediatitzar la interacció de les PKC amb els lípids de la membrana que actuen com a cofactors o moduladors.²⁸¹ A més, algunes PKC contenen una segona regió reguladora que inclou un domini de 50 aminoàcids anomenada CaLB i que es relaciona amb les accions Ca²⁺-depenents com la translocació a la membrana i la interacció amb els fosfolípids.^{103,281}

L'activació de les PKC comporta la inicialització o supressió d'una gran varietat de processos fisiològics en funció de l'isoenzim activat i del tipus i estadi cel·lular.^{66,245,480} Una de les accions més destacades és la transcripció de determinats gens. Dues són les vies per les que les quinases poden exercir la regulació de l'expressió gènica: 1) per activació de cascades fosforilatives com Ras/proteïna quinasa activada per mitògens, que comporta la fosforilació de proteïnes reguladores de la transcripció gènica;^{292,432} 2) per fosforilació de I- κ B, el que allibera la NF- κ B de manera que pot migrar fins al nucli on podrà activar directament la transcripció de determinats gens.³⁴¹ La primera de les vies s'associa a la transmissió de senyals proliferatius, mentre que la segona al control de la funció en les cèl·lules immunocompetents.

Les PKC estan implicades en el manteniment de l'homeostasi als colonòcits. La fosforilació dels residus de tirosina o serina de proteïnes diana per part de les PKC activades és un pas essencial en la resposta cel·lular davant hormones i factors de creixement. La regulació aberrant d'aquests enzims implica el trencament de l'homeostasi, el que s'associa amb processos cancerígens,⁵²³ arteriosclerosi,³⁸⁷ artritis,⁴⁹⁴ i malalties inflamatòries.²⁰ Algunes hipòtesis sobre la carcinogènesi es basen en l'activació de la PKC davant de factors de creixement i de dietes en un alt contingut de greix,^{261,403} aquests aspectes es revisaran més àmpliament al capítol 5 d'aquesta tesi. Contràriament, altres estudis han mostrat que la disminució en l'activitat total de la PKC a les lesions cancerígenes colòniques.^{327,427}

L'expressió diferencial dels diferents isoenzims de PKC té correspondència amb les zones de proliferació, diferenciació i apoptosi al llarg de l'eix de les criptes intestinals.^{121,228} A més, alguns isoenzims no s'expressen per igual al colon distal que al proximal.¹²² Als neoplasmes colònics, caracteritzats per l'alteració dels patrons arquitectònics i de la cinètica cel·lular, s'observen canvis en l'expressió dels diferents isoenzims durant el desenvolupament oncogènic com són un descens en l'expressió de PKC- α , PKC- β i PKC- δ i un augment en l'expressió de l'isoenzim PKC- ζ .^{121,225,518} No obstant això, l'expressió i activació enzimàtica pot variar en el temps com és el cas de la PKC- γ que durant les 15 setmanes posteriors a la inducció d'AOM es mostra elevada a la membrana, mentre que a les 37 setmanes hi ha un descens tant de la fracció citosòlica com particulada.^{225,226} A més, existeixen mecanismes independents pel que fa a la regulació de l'expressió i a la regulació de l'activitat de les PKC.^{226,518} Hi ha cèl·lules cancerígenes colòniques on la sobreexpressió de PKC- ζ suprimeix el creixement i minva la tumorigènesi,¹⁸² mentre que en altres l'efecte és l'invers.⁴³² En les cèl·lules tumorals colòniques CaCo-2, la sobreexpressió de la PKC- ζ promou la diferenciació i redueix el creixement.⁴³⁴ En cultius de cèl·lules normals o cancerígenes colòniques, la sobreexpressió o activació de PKC- ζ promou la tumorigènesi i la proliferació.^{365,524} Contràriament, en línies cel·lulars transformades tant colòniques com no epitelials

les PKC- α i PKC- β provoquen l'apoptosi de forma constitutiva.^{120,524} En canvi, la sobreexpressió de PKC- γ protegeix contra l'apoptosi induïda per fàrmacs.³¹⁸

Totes aquestes observacions suggereixen una complexa regulació del creixement, proliferació, diferenciació i apoptosi cel·lular per part dels diferents isoenzims de PKC, especialment durant el desenvolupament oncogènic. A més, la participació d'aquestes quinases en la biologia cancerígena colònica pot estar subjecta a factors reguladors addicionals provinents del metabolisme bacterià o de la dieta.^{122,395,403,518}

4.3.6. Els eicosanoides.

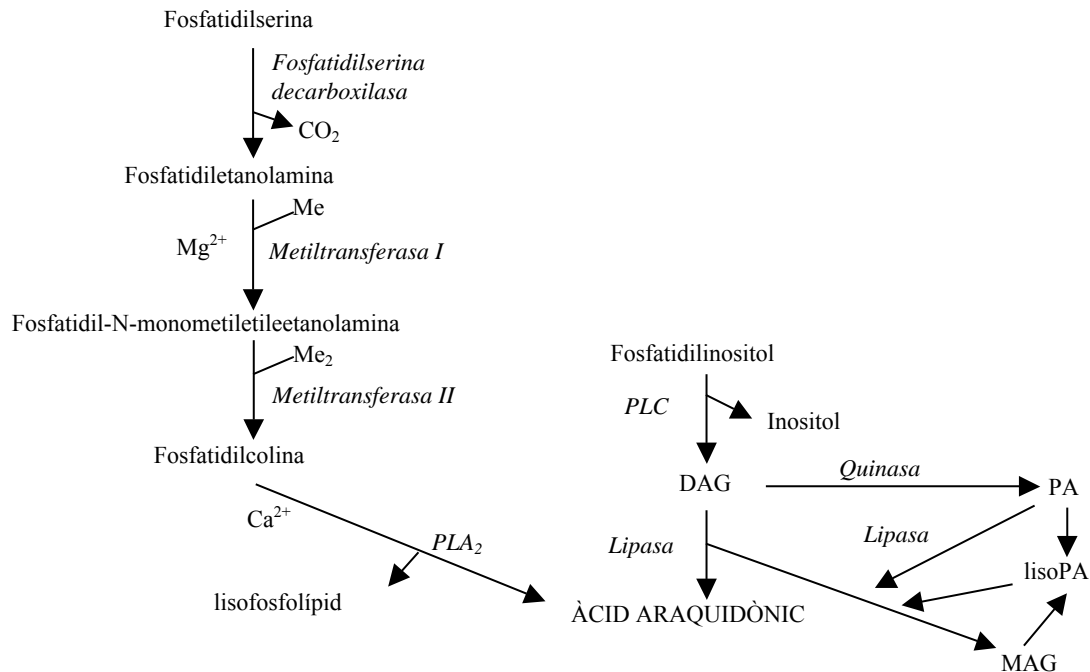
L'AA és el precursor dels principals eicosanoides bioactius. En els mamífers, l'AA incorporat a les membranes cel·lulars prové de la dieta o via elongació/dessaturació de l'àcid linoleic. La biodisponibilitat de l'AA constitueix el primer nivell de regulació del seu metabolisme.

L'alliberament d'AA de les membranes es pot explicar mitjançant dues hipòtesis, en les quals el Ca^{2+} adquireix un important paper com a segon missatger (**figura 4.3**). Segons la primera hipòtesi, després de la pertorbació de la membrana conseqüent a un estímul, s'activen les esterases i metiltransferases que transformen la fosfatidilserina a fosfatidilcolina.

Aquests canvis augmenten la fluïdesa de la membrana i la permeabilitat al Ca^{2+} . L'augment del flux de Ca^{2+} cap a l'interior cel·lular activa les fosfolipases. La PLA_2 allibera l'AA de la fosfatidilcolina, convertint-la en lisofosfatidilcolina.²⁰⁴

La segona hipòtesi contempla l'activació de la PLC, el que provoca el trencament del fosfatidilinositol alliberant PI_3 i DAG. De nou, l'increment de Ca^{2+} intracel·lular per l'acció del IP_3 activa les lipases, les quals actuen sobre l'àcid fosfatídic i el DAG alliberant AA.³⁹

Figura 4.3.: Esquema de la seqüència de reaccions implicades en les possibles vies d'alliberament de l'AA a partir de la fosfatidilserina i el fosfatidilinositol de la membrana cel·lular.¹²⁵



Les tres principals vies del metabolisme de l'AA són la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa i el citocrom P450. Dos enzims ciclooxigenàsics estan presents en els mamífers: la ciclooxigenasa-1 (COX-1) i la ciclooxigenasa-2 (COX-2).^{510,511} Ambdós enzims tenen la capacitat de convertir l'AA a prostaglandina G_2 (PGG_2) i seguidament, per l'acció hidroxidrasa, a prostaglandina H_2 (PGH_2). La COX-1 s'expressa de forma constitutiva, és a dir, els nivells d'aquesta proteïna no fluctuen davant estímuls extracel·lulars,⁵¹⁰ i està àmpliament distribuïda pel tracte gastrointestinal on intervé en el manteniment de l'homeostasi.²³² Malgrat l'alta ubiquïtat dels enzims ciclooxigenàsics, la COX-2 s'expressa principalment quan és induïda per citocines, factors de creixement i altres mitògens en general, fet que la relacionen directament amb processos inflamatoris i neoplàssics.^{116,124,146,511}

La segona ruta més important en el processament de l'AA cap a la formació d'eicosanoides és la via de la lipooxigenasa (LOX). El metabolisme a través d'aquesta via dona com a productes finals els leucotriens (LT), les lipoxines i els

AG hidroxilats. La darrera via enzimàtica capaç de metabolitzar l'AA és la del citocrom P450 que hidroxila aquesta molècula donant epòxid- i / -1-derivats.⁹⁰ Cadascuna d'aquestes vies metabòliques competeixen pel substrat i amb la reesterificació de l'AA als fosfolípids.⁴⁷⁰

En general, els eicosanoides poden considerar-se hormones locals amb una vida mitja molt breu. Actuant de manera autocrina, paracrina o intracrina sobre les cèl·lules. El metabolisme dels eicosanoides varia d'una cèl·lula a altra, segons la diferent maquinaria enzimàtica que predomina en un particular tipus cel·lular.¹⁴⁶

4.3.6.1. Metabolisme ciclooxigenàsic.

La biosíntesi de prostaglandines (PGs), tromboxans (TXs) i prostaciclins (PGI₂) s'inicia amb la formació dels endoperòxids cíclics inestables (PGG₂ i PGH₂) per l'acció catalítica dels enzims ciclooxigenàsics (**figura 4.4**). A continuació, enzims específics catalitzen el trencament dels enllaços entre oxígens, el que reestructura la molècula per generar diferents tipus de prostanoides. Aquestes accions enzimàtiques són reaccions d'isomerització i/o reducció, malgrat que hi ha isòmers o PGs secundàries estables que esdevenen de forma espontània.⁶⁶ Contràriament a l'alta ubiqüitat de les COX, els enzims específics pel metabolisme dels endoperòxids es localitzen a cèl·lules concretes on es produirà un determinat prostanoid. Aquesta característica constitueix un nivell de regulació que determinarà l'espectre d'eicosanoides produïts per un tipus cel·lular o teixit concret.

Al budell, els colonòcits estan capacitats per produir PGE₂, però la principal font és a nivell de cèl·lules mesenquimàtiques.^{113,211,273} Mentre que a l'epiteli colònic, concretament les cèl·lules epitelials superficials, es detecta una elevada capacitat degradadora dels prostanoides.¹¹² La disposició subepitelial en la producció de PGE₂ influència la funció de les cèl·lules epitelials com són la secreció de clor i la inhibició de l'absorció de NaCl, alhora que modula la

proliferació i diferenciació dels colonòcits.^{114,146} La PGI₂ i la PGD₂ són els principals productes prostaglandínics generats per la mucosa colònica, mentre que PGI₂ i PGE₂ són les prostaglandines generades de manera majoritària per la capa muscular del budell.²⁷³ A més, la PGF₂ i el TXA₂ són sintetitzats de forma constitutiva per l'epiteli intestinal.¹¹² Malgrat això, les principals fonts de síntesi de TXA₂ i PGI₂ són les plaquetes i l'endoteli vascular respectivament, alhora, ambdós eicosanoides constitueixen un exemple paradigmàtic de funcions biològiques oposades.⁹⁷

L'alteració del perfil prostaglandínic intestinal apareix als estats patològics o per manipulació dietètica, quan la biodisponibilitat de l'AA és compromesa i la PGE₂ adquireix més protagonisme al budell, tant qualitativa com quantitativament.²⁷³ Aquest desequilibri en la producció d'eicosanoides es tradueix en el trencament de l'homeostasi intestinal que, addicionalment, en patologies com la inflamació, està clarament influenciada per l'aparició de cèl·lules immunocompetents a la *lamina propria*.^{124,163}

Els eicosanoides han estat relacionats amb la patogènia del càncer colorectal. Estudis en humans han suggerit una reducció en la mortalitat per aquesta patologia neoplàstica entre individus usuaris d'antiinflamatoris no esteroïdals que inhibeixen la síntesi de prostaglandines.^{180,500} Observacions addicionals en pacients amb poliposi familiar adenomatosa tractats amb sulindac mostren una reducció significativa en la mida i número d'adenomes.^{260,413,464} S'ha observat, així mateix, un descens en el número i mida de tumors i en el número de formacions preneoplàssiques (FCA) a diferents models experimentals davant l'acció quimioprotectora de l'aspirina o per inhibidors específics de la COX-2.^{25,111,349,402} Estudis en ratolins amb un al·lel del gen *APC* mutat mostren una marcada disminució en el número de pòlips intestinals si tenen el gen de la COX-2 inactivat respecte als que el tenen funcional.³⁴⁸ Contràriament a l'expressió constitutiva de la COX-1 per tot el tracte gastrointestinal,²³² la COX-2 es mostra expressada en el 50% dels adenomes i en el 85% dels adenocarcinomes colònics humans.¹⁴⁵ Aquesta

sobreexpressió de la COX-2 s'associa amb un augment concomitant en la producció de PGE₂ i PGI₂ a les lesions tumorals.^{36,187,383,442} Addicionalment, estudis de cèl·lules epitelials transfectades amb COX-2 mostren un increment en la síntesi de prostanoides i una reducció en la taxa apoptòtica.⁵⁰³ A més, existeixen línies de cèl·lules tumorals colòniques que sobreexpressen de forma constitutiva la COX-2.^{106,230,504} Estudis immunohistoquímics i d'hibridació *in situ* han mostrat que la sobreexpressió de la COX-2 es dona tant a les cèl·lules epitelials transformades com en cèl·lules mesenquimàtiques, endotelials i inflamatòries associades als tumors.^{257,431} Altres evidències apunten la possibilitat que la sobreexpressió de la COX-2 sigui un esdeveniment inicial afavorit per l'aparició de mutacions en els gens *APC* o *ras*.^{348,442,530} En definitiva, totes aquestes evidències aporten arguments a favor de la participació del metabolisme ciclooxigenàsic en la promoció tumoral colònica. No obstant això, els mecanismes fisiopatològics pels que la sobreexpressió de la COX-2 o la producció de prostanoides participen en el procés de transformació fenotípica de les cèl·lules epitelials colòniques no són coneguts.

A l'actualitat s'han proposat diversos mecanismes pels que el metabolisme ciclooxigenàsic participa en la promoció tumoral. Diversos grups d'investigació han mostrat que l'acumulació intracel·lular d'AA no esterificat pot promoure l'apoptosi per un mecanisme independent a la síntesi de prostanoides i que possiblement podria implicar l'estimulació de la producció de ceramida.^{89,93} Aquests estudis suggereixen que l'increment en els nivells de COX-2 disminueixen l'AA intracel·lular i, per tant, es redueix la taxa apoptòtica amb un clar efecte protumoral. No obstant això, altres grups associen directament la PGE₂ amb la inhibició de la mort cel·lular programada a través de l'expressió del gen *Bcl-2*,^{444,503} o per l'elevació de l'AMPc intracel·lular.³⁴⁷

D'altra banda, malgrat l'existència d'estudis on no s'observà un efecte directe dels metabòlits ciclooxigenàsics sobre la proliferació cel·lular a la mucosa colònica,¹¹⁵ altres estudis han evidenciat una significativa capacitat mitogènica de la PGE₂ sobre l'epiteli colònic normal i inflammat.^{189,536} Recentment, malalts amb un

elevat risc de desenvolupar càncer colorectal normalitzaven els patrons proliferatius a l'epiteli rectal després d'haver-los administrat oli de peix, aquest descens de la proliferació cel·lular coincidia amb a un descens de la concentració d'AA.^{11,12} Tanmateix, efectes similars de l'oli de peix sobre la proliferació epitelial al recte s'observaren entre individus sans.²⁸ En definitiva, el que aquests darres estudis suggereixen, junt a estudis amb animals,³¹² és la possibilitat que un dels mecanismes implicats amb l'efecte antiproliferatiu de l'oli de peix sigui l'alteració dels nivells intracolònics de PGE₂.

Altres mecanismes pels que el metabolisme ciclooxigenàsic participa en la promoció tumoral involucra aspectes immunosupressors (alteració en la funció de macròfags, en el nombre de receptors de membrana i en la producció de citocines),^{35,151,202,503} angiogènics,^{349,376} i canvis fenotípics que afecten a la capacitat adhesiva i invasiva de les cèl·lules transformades.^{503,504} Addicionalment, la síntesi de prostaglandines està acompanyada per la generació de malonildialdehid (**figura 4.4**), un conegut mutagen i carcinogen.³⁰

Els senyals intracel·lulars protumorals mediades per la PGE₂ als colonòcits probablement són dutes a terme a través de receptors de membrana associats a la proteïna G.^{146,378} De fet s'ha suggerit que les accions paracrines i autocrines de la PGE₂ estan relacionades amb un augment de l'AMPc intracel·lular.¹¹⁴ Alternativament, les prostaglandines podrien actuar de forma intracrina a l'unir-se a receptors nuclears. La localització perinuclear de la COX-2 i l'existència de factors de transcripció activats per derivats prostaglandínics, com els receptors activadors de la proliferació de peroxisomes, associen el metabolisme ciclooxigenàsic amb la transcripció gènica.^{70,354,511} En aquest sentit, l'expressió o activació de gens protumorals com *Bcl-2* o la promoció de la proliferació cel·lular s'han relacionat amb les accions del receptor activador de la proliferació de peroxisomes- .

En definitiva, les evidències obtingudes fins ara suggereixen que les prostaglandines allarguen el cicle cel·lular i redueixen l'apoptosi, el que possiblement comporta l'acumulació d'alteracions genètiques que poden dotar a la cèl·lula d'avantatges en la supervivència i en la transformació maligna.

4.3.6.2. Metabolisme lipoxigenàtic.

Les lipooxigenases són enzims que catalitzen l'oxidació dels AGPI generant AG hidroperoxidats, hidroxilats, epòxids (leucotriens -LT-) i altres formes més complexes d'AG. Els mamífers disposen de la 5-, 12- i 15-lipooxigenasa (LOX), anomenades així segons la seva capacitat d'introduir un oxigen molecular en una posició determinada de l'AA (**figura 4.4**).⁴²⁹ A l'igual que succeïa pels prostanoides, cada tipus cel·lular pot contenir diferents enzims lipooxigenàsics i, addicionalment, produir diferents metabòlits secundaris. Així, per exemple, a diferència de les cèl·lules polimorfonuclears humanes que presenten activitat 5- i 15-LOX, les plaquetes mostren exclusivament activitat 12-LOX i els eritròcits, malgrat no expressar 5-LOX, sintetitzen LTB₄ a partir del LTA₄ excretat pels neutròfils per acció del l'enzim LTA₄-hidrolasa.^{196,429}

El metabolisme lipooxigenàtic, principalment de la 5-LOX, està associat a les cèl·lules mieloides. La 5-LOX catalitza la hidroperoxidació de l'AA esdevenint la formació de l'àcid 5-hidroperoxi-6,8,11,14-eicosatetraenoic (5-HPETE). Consecutivament, la reducció de 5-HPETE comporta la formació, bé l'àcid 5-hidroxi-6,8,11,14-eicosatetraenoic (5-HETE) o bé de l'àcid 5,6-òxid-7,9-*trans*-11,14-*cis*-eicosatetraenoic, més conegut com LTA₄. El LTA₄ pot ser metabolitzat per dos enzims específics que produiran diferents productes bioactius. El primer d'aquests enzims és el LTA₄-hidrolasa que catalitza l'hidròlisi del LTA₄ a LTB₄. El segon enzim, LTC₄-sintasa o glutatió S-transferasa, catalitza la conjugació del LTA₄ a un glutatió tripeptídic generant LTC₄. El metabolisme del LTC₄ pot continuar per acció d'una -glutamil-transpeptidasa que dóna el LTD₄. Finalment, l'acció d'una

dipeptidasa sobre LTD₄ provoca la pèrdua d'un residu de glicina el que comporta la formació del LTE₄.⁴²⁹

L'actuació enzimàtica de la 12- i 15-LOX, de forma similar a la de la 5-LOX, produeix els àcids 12- i 15-hidroperoxieicosatetranoics i 12- i 15-hidroxiieicosatetranoics (HPETE i HETE).¹²⁴ A més, l'AA també pot ser metabolitzat a través de l'acció combinada dels enzims 5- i 15-LOX, el que produeix diHETE que acaba generant lipoxines.⁴²⁹

La 5-LOX ha estat identificat com un enzim citosòlic amb una massa de 78 Kd, tot i que també ha estat localitzada al nucli.⁶⁹ L'activació de la 5-LOX requereix ATP i Ca²⁺, el que li permet translocant-se a la membrana plasmàtica o al reticle endoplasmàtic on s'uneix a una proteïna específica activadora que li facilita l'accés a l'AA lliure.^{196,291,538}

Els LTs regulen processos immunoinflamatoris. En aquest sentit, el LTB₄ indueix l'adhesió a l'endoteli i una important resposta quimiotàctica en els leucòcits i estimula l'agregació, secreció d'enzims lisosomals i generació de superòxid en els neutròfils.^{196,429} A més, el LTB₄ té la capacitat d'estimular l'activitat de la 5-LOX augmentant els nivells de Ca²⁺ intracel·lular.⁵³⁸ La modulació de les respostes proliferatives en cèl·lules immunocompetents ha estat associada a l'actuació del LTB₄, possiblement per l'estimulació de la síntesi de la IL-1, -2 o -6.¹⁹⁶ D'altra banda, els leucotriens peptídics són, principalment, potents inductors de la contractibilitat de la musculatura lliça, el que es tradueix en accions bronco i vasoconstrictores, augment de la permeabilitat vascular i secreció de mucus a les vies aèries.^{196,429}

Els leucotriens generats davant un estímul són extrets al medi extracel·lular on exerciran les seves accions fisiològiques a través dels receptors de superfície de les cèl·lules diana. A l'actualitat s'han descrit receptors a la superfície dels neutròfils i eosinòfils amb alta i baixa afinitat pel LTB₄, alhora que pels leucotriens

sulfopeptídics s'han identificat receptors amb molta variabilitat pel que fa a l'especificitat entre animals i humans.¹⁹⁶ Estudis recents, relacionen la regulació de l'activitat inflamatòria amb l'unió del LTB₄ al receptor activador de la proliferació de peroxisomes-¹³⁸ Tal i com succeïa per les prostaglandines, la presència d'aquests receptors intranuclears activats pels eicosanoides permet relacionar les accions dels lípids bioactius amb mecanismes d'expressió gènica.

Malgrat que la producció dels leucotriens està, en general, associada a les cèl·lules inflamatòries, les cèl·lules epitelials intestinals tenen la capacitat d'expressar els enzims lipooxigenàsics. No obstant això, apareixen particularitats entre espècies. Així es pot observar el contrast entre la capacitat de produir leucotriens per les cèl·lules epitelials colòniques de rata i la no detecció de la 5-LOX en l'epiteli ileal de porc.^{113,249} La detecció dels metabòlits lipooxigenàsics (LTB₄, 5-, 12- i 15-HETE) es localitza principalment a l'epiteli proliferatiu intestinal a la rata.^{113,115} Estudis amb cèl·lules tumorals intestinals han identificat l'expressió de 5- i 15-LOX.^{451,517} A més, el subtipus 1 de la 15-LOX està significativament sobreexpressada al teixit colònic tumoral respecte al teixit normal adjacent.²¹⁵

A l'actualitat hi ha poc coneixement sobre el paper de les lipooxigenases a la carcinogènesi. Existeixen estudis que han suggerit un protagonisme per part de la 12- i 15-LOX en el creixement i la diferenciació cel·lular. Concretament, la 15-LOX subtipus 1 augmentaria i la 12-LOX disminuiria l'apoptosi.^{451,490} En aquest sentit, s'ha suggerit que els metabòlits de la 5-LOX podrien bloquejar l'apoptosi.^{344,490} Addicionalment, s'ha observat que els inhibidors de les COXs provoquen un augment en l'expressió dels enzims lipooxigenàsics.^{451,490} Inesperadament, això no esdevé en un augment en la producció de LTB₄ a la mucosa colònica.¹⁷⁰ Un efecte similar ha estat identificat en cultius de cèl·lules CaCo-2, on la suplementació amb butirac augmenta l'expressió de la 5-LOX sense un augment concomitant de la seva activitat.⁵¹⁷ Recentment, s'ha mostrat que l'addició de LTB₄ i LTD₄ a cultius de cèl·lules epitelials colòniques no transformades augmenten els nivells proteics

de COX-2, -catenina i Bcl-2, el que s'associa amb un augment de la supervivència cel·lular.³⁴⁴

En definitiva, tant els leucotriens com les prostaglandines són mediadors lipídics, generalment associats a la inflamació, que poden influir sobre la transformació neoplàsica de les cèl·lules intestinals.

Figura 4.4.: Metabolisme lipoxigenàtic i ciclooxigenàtic de l'AA.

